

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin—Neukölln
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit
EURATOM, München

**Vergleich der Färbung Fixierter Blutaussstriche
Vermittels Brilliantkresylblau mit der
Supravitalfärbung**

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn- Mund- und Kieferheilkunde der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnärztin Margit Wester, geb. Stark

aus Berlin

1973

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin—Neukölln
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit
EURATOM, München

**Vergleich der Färbung Fixierter Blutausstriche
Vermittels Brilliantkresylblau mit der
Supravitalfärbung**

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn- Mund- und Kieferheilkunde der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnärztin Margit Wester, geb. Stark

aus Berlin

Referent: Professor Dr.med.Irene Boll

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Baldur Kempfle

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Zahn-,Mund-und Kieferheilkunde der Freien Universität
Berlin



Promoviert am: 14. November 1973

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
EINLEITUNG	1 - 10
FRAGESTELLUNG	11 - 12
METHODE	13 - 17
ERGEBNISSE	
a. Zähltabellen	18 - 27
b. Graphische Darstellungen	28 - 33
c. Photographien	34 - 36
d. Statistik	37
e. Besprechung der Ergebnisse	38 - 39
DISKUSSION	40 - 43
ZUSAMMENFASSUNG	44
LITERATURVERZEICHNIS	45 - 50



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E I N L E I T U N G

Als Reticulozyten werden diejenigen roten Blutkörperchen bezeichnet, die bei Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen durch das Vorhandensein der Substantia reticulo-filamentosa charakterisiert sind. Diese, abgekürzt als Sgf bezeichnete Netzstruktur, wurde 1881 von Ehrlich (9) erstmals deutlich dargestellt und in Form von "feinen, dichten und eleganten Netzen" beschrieben.

Ferner wurden die Reticulozyten beobachtet und im Detail beschrieben von Foá (1888), Celli und Guarnieri (1889), Howell (1890) und von Israel und Pappenheim (1896). In den folgenden Jahren wurden die Reticulozyten Gegenstand einer Anzahl von Untersuchungen, hauptsächlich durch deutsche und italienische Forscher.

Cesaris-Demel (6) konnte 1907 Granulationen in den Erythrozyten des Menschen nachweisen. Seine Beobachtungen unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen führten zu dem Schluß, daß es sich stets um "junge Elemente medullären Ursprungs handelt, so daß ihre Anwesenheit im Kreislauf auf ein Erwachen der hämatopoetischen Funktion des Knochenmarks hinweist". Seine Beobachtungen wurden zuerst von vielen Seiten bestritten, jedoch kamen später zahlreiche internationale Autoren zu den gleichen Schlußfolgerungen. Schilling (35), Seyfarth (37) und Engel (10) kamen durch ihre Untersuchungen 1912 bzw. 1926 zu der Auffassung, daß Reticulozyten bestimmte Reifestadien eines jeden Erythrozyten sind.

Die Streitfrage, ob die Reticulozyten alte rote Blutkörperchen im Prozeß der Disintegration, ob sie wenig geformte,

nur untergeordnete Erythrozyten mit kurzer Lebensspanne waren oder ob das Reticulozytenstadium ein normales Stadium am Anfang der Entwicklung aller Erythrozyten ist, hat heute nur noch ein historisches Interesse. Letzte Ansicht hat sich dann durchgesetzt. Hinsichtlich der karyogenen und plasmogenen Abstammung der Sgf wissen wir heute, daß die der Sgf zu Grunde liegende besophile Substanz aus Protoplasma-teilen der kernhaltigen roten Vorstufe entsteht, was die schon von Ehrlich geäußerte Ansicht bestätigt.

Hiermit wurde die Grundlage einer pathogenetischen Einteilung der verschiedenen Anämieformen gefunden. Gleichzeitig wurde es möglich, die therapeutischen Erfolge verschiedener Arzneimittel durch die Reticulozytenzählungen zu kontrollieren. Otto Naegeli (25) schrieb 1923: "Für den Verlauf einer Anämie gehört die Berücksichtigung der vital granulären Reticulozyten unbedingt zu den wichtigsten Kriterien".

Ab 1922 hat der Ausdruck "Reticulozyt" aus dem amerikanischen Schrifttum auch in der deutschen Literatur in zunehmendem Maße Verbreitung gefunden. Sinnvoller wäre aber nach Undritz (42) die Bezeichnung Proerythrozyt, die sich jedoch bisher nicht durchsetzen konnte.

Nach Dunkelfeldbeobachtungen an Reticulozyten berichtet Riva 1949: ". . . . daß die basophile Tüpfelung als Protoplasmabestandteil und nicht als Abkömmling des Kerns zu betrachten ist, dürfte heute so gut wie sicher sein". Lindigkeit (20) konnte 1957 beweisen, daß in den Reticulozyten keine kernspezifischen Desoxyribonucleinasen mehr vorhanden sind oder nur in unbedeutenden Spuren. Die mikro-

spektrographischen Methoden von Thorell (41) brachten das gleiche Untersuchungsergebnis.

Mit dem Phasenkontrastverfahren beobachtete Siering (39) 1956 Erythrozyten nach begonnener Hämolyse. Vergleichende Zählungen dieser von ihm angewandten Methode und der Färbung mit Brilliantkresylblau ergaben vollkommen entsprechende Werte. Rind und Stobbe (32) bericht^{te}n 1957: "Die phasenoptischen Vitalbeobachtungen über die Bildung und Reifung der Reticulozyten bestätigen die bisherige Auffassung von dieser Zellart als unreife, jugendliche Erythrozyten, die durch Entkernung des Erythroblasten entstehen. Bei den in Reticulozyten nachweisbaren phasenpositiven Granula handelt es sich offenbar um die im Zellprotoplasma verbliebenen Mitochondrien und Mikrosomen." Auf Grund bestimmter Kriterien (besondere Form, Größe, Motilität, Vorliegen phasenpositiver Granula) zeigten Stobbe und Rind (39) 1959 eine weitgehende Identität jugendlicher Erythrozyten mit supravitalgefärbten Reticulozyten.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen kommt Wolpers (46) zu dem Schluß: "Reticulozyten haben eine reale Innenstruktur, die aus Granula und zytoplasmatischer Substanz (auch Mikrogranula) zusammengesetzt ist!"

Die Reifung der Erythroblasten des Knochenmarks zu Erythrozyten geht mit einem Verlust an Nukleinsäure einher. Im Verlauf der Reifung verschwindet mit dem Verlust des Zellkerns größtenteils auch die kernspezifische Desoxyribonucleinsäure (DNS), während die Ribonucleinsäure (RNS) bis zum Stadium des Reticulozyten erhalten bleibt. Die Sgf, die

den Reticulozyten morphologisch charakterisiert und die bei der weiteren Reifung ebenfalls abgebaut wird, besteht danach aus RNS (20,41). Der reife Erythroblast, auch Normoblast genannt, hat die Fähigkeit zur DNS- und RNS-Synthese verloren und damit auch die zu weiterer Reduplikation.

Während der weiteren Ausreifung ist der Reticulozyt noch in geringerem Maße zur Syntheseleistung fähig. Er verfügt noch über eine aktive Atmung. Morawitz (24) und Warburg (44) stellten im Jahre 1909 bei Inkubation von reticulozytenreichem Blut einen deutlich erhöhten O_2 -Verbrauch fest. Heilmeyer (44) und Westhäuser (16) konnten 1932 diese Untersuchungsergebnisse bestätigen. Rappoport (29) berichtete 1957, daß die Atmungsaktivität der Reticulozyten etwa 50mal größer ist als die der Erythrozyten. Außerdem konnte er noch eine Reihe aktiver Fermente (Atmungskette, Zitronensäurecyclus, Succinatoxydase) in ihnen nachweisen.

Walsh, Thomas und Chow (43) verfolgten 1949 erstmalig in vitro den Einbau der radioaktiven Isotope ^{59}Fe in Reticulozyten. Sie waren der Meinung, daß die ^{59}Fe -Aufnahme ein Zeichen für die Hb-Synthese von Reticulozyten sei.

Autoradiographische Untersuchungen (1,4) brachten den Beweis, daß die granulierten Erythrozyten Eisen aufnehmen und enzymatisch mit Protoporphyrin zu Häm, der prostetischen Gruppe des Hämoglobins, vereinigen. Auch die Globinkomponente des Hb-Moleküls wird im Reticulozyten synthetisiert (5).

Der Prozeß der Reifung der Reticulozyten geht mit einem Verlust der gesamten RNS einher. Beim RNS-Abbau spielen nicht nur die Einwirkung der abbauenden Enzyme, z.B. RNasen, eine Rolle, sondern Schweiger (40) konnte auch

eine Energieabhängigkeit des Prozesses beobachten. Seine Untersuchungen bestätigten, daß das Verschwinden der Sgf als morphologisches Maß für die Reifung der Reticulozyten verwendet werden kann. Weiter erkannte er einen Zusammenhang zwischen RNS-Abbau und Hämoglobinsynthese: "Es sieht so aus, als ob in den Reticulozyten der RNS-Abbau dazu führt, daß zumindest eine der an Proteinsynthese beteiligten RNS-Fractionen zum limitierenden Faktor der Hämoglobinsynthese wird, daß aber umgekehrt durch die Hämoglobinsynthese der RNS-Abbau verstärkt wird. Auf diese Weise würden RNS-Abbau und Hämoglobinsynthese wechselseitig voneinander abhängen und jenen Vorgang dirigieren, der als Reifung in wenigen Stunden die Reticulozyten zu Erythrozyten werden läßt".

Heilmeyer und Westhäuser (16) nahmen nach Vitalfärbung 1932 eine heute noch gebräuchliche Einteilung nach der Menge der anfärbbaren Substantia granulofilamentosa vor.

Qualitative morphologische Einteilung der Reticulozyten



Gruppe O Kernhaltige Erythrozyten

Die vitalfärbbare Substanz umgibt als dichtes Netzwerk den pyknotischen Kern. Normalerweise nur im Knochenmark.

Gruppe I Knäuelform

Die vitalfärbbare Substanz liegt als dichtes Knäuel in der Mitte der roten Blutzelle an Stelle des verschwundenen Kerns. Zellen dieser Gruppe kommen im Blut des Gesunden so gut wie nicht vor.

Gruppe II Netzform

Die vitalfärbbare Substanz liegt aufgelockert und netzförmig über der ganzen Zelle verteilt. Diese Zellart kommt vereinzelt beim Gesunden vor.

Gruppe III Unvollständige Netzform

Das Netzwerk ist bereits in Auflösung. Die Substanz gruppiert sich meist am Rande und läßt die Mitte frei. Zellen dieser Gruppe kommen beim Gesunden häufiger vor.

Gruppe IV Körnchenform

Die vitalfärbbare Substanz findet sich nur noch in Form von vereinzelt Körnchen oder feinsten Fäden an der Peripherie der Zelle. Zellen dieser Gruppe sind die häufigste Form der Reticulozyten beim Gesunden.

Quantitative Betrachtungen

Reticulozyten werden quantitativ auf die Erythrozyten bezogen. Die Zahlenangaben über die Reticulozyten pro 1000 Erythrozyten sind sehr unterschiedlich.

Rosin und Bibergeil (33) ermittelten 1904 Werte von 20%, Engel(10) sagte 1936 5-20% als Normalwert an. Cohn (7) kam 1926 auf Werte von 0-4%, während Seyfarth (37) und Schilling (35) 1927 Zahlenwerte von 1-2% angaben. Heilmeyer (16) vertrat den Standpunkt, daß 8% und bei Einzelfällen bis zu 14% normalerweise vorkommen können. Höhere Werte, die von anderen Autoren angegeben werden, führte man auf fehlerhafte Technik zurück. Ederle (8) berichtete 1933 in seiner Arbeit: "Als Mittelwert aus sämtlichen Untersuchungen ergab sich ein Wert von 15,8%, bei Schwankungen von 7-26%. Ein sicherer zahlenmäßig zu erfassender Einfluß des Geschlechts konnte nicht festgestellt werden". Seip (36) gibt einen Durchschnittswert von 15,7% an mit Abweichungen zwischen 9,6 bis 23%. Er fand bei Männern (13,5%) einen niedrigeren Wert als bei Frauen (17,3%). Heimpel (17) ermittelte 1968 mit Brilliantkresylblaufärbung einen Normalwert von 5-20% und fand nach mehrmaligen Zählungen Schwankungen bis zu 30%. Für die auftretenden Reticulozytenschwankungen werden in der Literatur viele Gründe angegeben wie Strahleneinwirkung, Hormone, chemische Einwirkungen, Höhenklima oder bestimmte Jahreszeiten. 1939 schrieb Barbier(2): "An Hand von Kurven wird gezeigt, daß bei mehreren Menschen gleichzeitige und gleichsinnige Schwankungen der Reticulozytenzahl im strömenden Blut auftreten. Außerdem werden als Versuch, die Ursache dieser Schwankungen zu klären, Luftdruckschwankungen als Ausdruck kosmischer Vorgänge herangezogen.". Dagegen konnte Seip (36) keine tageszeitlichen Schwankungen nachweisen.

Bei der Bewertung der Reticulozytenzahlen muß man bedenken, daß der prozentuale statistische Fehler bei den niedrigen Reticulozytenwerten und der üblichen Auszählung von nur 1000 Erythrozyten groß ist. Seip (36) und Rümke (34) haben Tabellen zur einfachen Berechnung des statistischen Fehlers zusammengestellt.

Neuerdings werden von manchen Autoren die Reticulozytenzahlen als absolute Werte/mm³ angegeben. Der Normalwert aus diesen Direktzählungen liegt bei 35 000- 75 000/mm³.

Die Bestimmung der Reticulozytenzahl ist ebenso für das Erkennen einer Anämie ein wichtiges Hilfsmittel wie für die Beobachtung einer erfolgreichen Behandlung.

Bei einer primären Störung des Knochenmarks wie z.B. der perniziösen Anämie (Störung der DNS- Reduplikation und Hämoglobinsynthese durch Cobalaminmangel) ist der Färbeindex erhöht und die Erythrozyten sind übernormal groß (8-9 μ). Man spricht auch von hyperchromer oder makrozytärer Anämie. Hierbei ist die absolute Zahl der Reticulozyten stets vermindert, relativ sind sie manchmal etwas vermehrt. Häufig finden sich abnorm unreife Reticulozyten mit Knäuel- und Netzstruktur (15).

Tritt die Anämie sekundär durch Eisenmangel, Blutverlust oder Infektionskrankheiten auf, so ist nach Heilmeyer (14): ". . . das Blutbild gekennzeichnet durch eine meist starke Erniedrigung des Färbeindex. Das Zellvolumen zeigt ebenfalls meist eine Verminderung auf 50-70 μ^3 (normal 90 μ^3). Die Reticulozytenzahlen sind relativ oft etwas vermehrt, absolut jedoch meist vermindert. Auch findet man eine deutliche Linksverschiebung der Reticulozyten nach den unreifen Gruppen I und II der qualitativen Auswertung."

Bei hämolytischen Anämien werden nicht selten Reticulozy-

tenzahlen bis 400% beobachtet: Bei schwersten, erworbenen, hämolytischen Anämien können im Einzelfalle vorübergehend Werte bis zu 800% erreicht werden. Sonst findet sich die Vermehrung der Reticulozytenzahl eine Woche nach begonnener Vitamin B₁₂- oder Eisentherapie und nach akutem Blutverlust.

Differenzierung von Blutzellen

1. Die panoptischen Färbungen

Sie haben in der Zytologie einen besonders wichtigen Platz, da sie die kennzeichnenden Strukturen besser als irgendwelche anderen Färbemethoden darstellen können. Sie sind leicht durchzuführen und auch unter ungünstigen äußeren Verhältnissen leicht reproduzierbar.

Pappenheim (27) mischte 1901 eine panoptische Triacidfärbung für Blutaussstriche. Giemsa (11,12,13) beschäftigte sich in den Jahren 1902-1924 in vielen Veröffentlichungen mit der nach ihm benannten Färbung. May und Grünwald (21,22) lieferten Beiträge zur Blutzellfärbung in den Jahren 1904 und 1906. Ihre und Giemsas Färbungen drängten die Triacidfärbung und das Hämatoxylin-Eosin in den Hintergrund. Pappenheim (26,28) kombinierte die May-Grünwald- und Giemsa-Färbung.

2. Die Supravitalfärbung

Mit dieser Darstellung besteht die Möglichkeit, noch lebende (bzw. überlebende) Blutzellen mit Farbstoffen anzufärben, die schnell in die Zelle eindringen und eine gewisse

Beständigkeit aufweisen. Sie erleichtert auch die Darstellung solcher Zellstrukturen, die in fixierten Ausstrichpräparaten, d.h. nach Ausfällung der Eiweißstrukturen, keiner Färbung mehr zugänglich sind.

Als erster hat Ehrlich auf das Vorliegen der zarten, netzartigen Gebilde in unfixierten Erythrozyten mit Methylenblau hingewiesen.

Cesaris-Demel (6) beschrieb Thioxin, Unnas Polychromblau, Dahlia, Naphtylenblau, Cresylviolett und Brilliantkresylblau als Farbstoffe für Frischpräparate. Letzteres zeigte eindeutig die besten Resultate. Es wurde später auch von Schilling (35) und Seyfarth (37) benutzt.

Lange war man sich nicht einig, ob man die Blutzellen am fixierten oder lebenden Präparat anfärben sollte. Für die klinische Routine entschied man sich dann wegen der beschriebenen Vorteile für die panoptische Färbung auf Ausstrichen. Die Supravitalfärbung blieb der Beobachtung der Zellfunktion, also der Forschung, vorbehalten und wurde endgültig erst durch das Phasenkontrastverfahren 1950 in den Hintergrund gedrängt.

So ist zur Zeit die einzige noch gebräuchliche Supravitaldarstellung in der Routine die Reticulozytenzählung. Sie wird aber auch schon durch die Absolutzählung in der Kammer abgelöst.

F R A G E S T E L L U N G

Alle Autoren, die sich mit Reticulozytenfärbungen beschäftigten, sind sich darin einig, daß die Werte der Reticulozytenzählungen stark von der angewandten Technik abhängen.

In unserem Labor wurde eine Färbemethode entwickelt, mit der es gelang, Reticulozyten in Knochenmarkausstrichen darzustellen. Regensburger (30) beschrieb diese Technik.

Wir kamen nun zu der Überlegung, daß die neue Methode der Reticulozytenfärbung in Knochenmarkausstrichen auch für Blutausstriche anwendbar sein müßte. Folgende Vorteile versprachen wir uns von dieser neuen Reticulozytenfärbetechnik bei routinemäßiger Anwendung im Labor. Die Differenzierung des weißen Blutbildes und das Auszählen der Reticulozyten könnte auf ein und demselben Präparat vorgenommen werden. Das würde nicht nur zu einer Zeitersparnis führen, vor allem würde eine Vermehrung der Reticulozyten bei jedem Blutbild gleich miterfaßt, wodurch vermutlich haemolytische Anämien häufiger als bisher kenntlich würden.

In der folgenden Arbeit haben wir drei Färbemethoden durchgeführt und die Zählergebnisse gegenübergestellt:

- I. Reticulozytenfärbung nach der bei uns bisher im Labor angewandten Methode: Supravitalfärbung mit Brilliantkresylblau nach Wolfer-Schudel.

II. Reticulozytenfärbung von Blutausstrichen nach der neu entwickelten Methode mit Brilliantkresylblau.

III. Reticulozytenfärbung nach der neu entwickelten Methode, gegengefärbt mit Giemsa-Lösung.

Nach dem Auszählen der Blutausstriche nach den drei beschriebenen Methoden sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Weichen die Ergebnisse der Reticulozytenzahl, gezählt nach Färbung III, von der mit Färbung I ab?
2. Macht sich die Gegenfärbung in veränderten Reticulozytenwerten beim Vergleich der Färbung II mit der Färbung III bemerkbar?
3. Ändert sich die prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Reticulozytenformen in Klasse O, I, II, III und IV bei den verschiedenen Färbeverfahren?
4. Falls eine Reduktion der Reticulozytenzahl mit Färbung III eintritt, wie ist die Größe der Reduktion zu bewerten? Kann man trotzdem die neue Reticulozytenfärbung als Routineuntersuchung im Labor empfehlen?
5. Waren Besonderheiten der kernhaltigen Zellen in Farbe, Form und Zeichnung der Sgf beim Mikroskopieren zu beobachten?

M E T H O D E

Es wurden 10 Patienten mit erhöhten Reticulozytenzahlen für die vergleichenden Untersuchungen ausgewählt, da Seip (36) feststellte, daß in Fällen von hohem Reticulozytengehalt das Zählen von 1000 Zellen ausreicht.

Das Venenblut der ausgewählten Patienten war zur Gerinnungshemmung mit Titriplex III versetzt (auf 1 cm³ Blut 1 Tropfen Titriplex III).

Es wurden Objektträger aus farblosem, fehlerfreiem Glas verwendet, die gründlich gereinigt, poliert und vor Staub geschützt in Gläsern aufbewahrt waren.

I. Supravitalfärbung nach Wolfer-Schudel (mit Brilliantkresylblau gefärbt)

Auf die Objektträger wird für diese Färbung dünn eine gesättigte 5%ige alkoholische Brilliantkresylblaulösung ausgestrichen und getrocknet. Mit diesen so vorbehandelten Objektträgern kann auf zwei Arten weiter gearbeitet werden:

1. In die Mitte des Brilliantkresylblau-Objektträgers wird ein kleiner Tropfen Patientenblut gebracht, mit einem Deckgläschen zugedeckt, leicht hin- und herbewegt und für zwei Stunden in eine feuchte Kammer gebracht. Danach muß das Präparat ausgewertet werden.
2. An den rechten Rand des Brilliantkresylblau-Objektträgers wird ein kleiner Tropfen Patientenblut gebracht. Dieser wird mit einem Deckgläschen ausgestrichen. Das so gewonnene Präparat kommt für 30-40 Minuten in eine

feuchte Kammer. Danach wird das Präparat luftgetrocknet und ist bei sachgemäßer Lagerung lange auswertbar.

Beide Methoden sind im hämatologischen Labor des Städtischen Krankenhauses Neukölln üblich. Es wurde die zweite Methode gewählt, weil sie gegenüber der ersten für diese Arbeit folgende Vorteile hatte:

- a. Die Verweildauer in der feuchten Kammer betrug nur ungefähr ein Viertel Zeit der ersten Färbung.
- b. Die Präparate können längere Zeit aufbewahrt werden und müssen nicht sofort gezählt werden.
- c. Zur Differenzierung eignen sich die Präparate etwas besser, da die Zellen in dem getrockneten Präparat nicht so leicht verschwimmen.

Als feuchte Kammer diente eine quadratische Plastikschaale mit Deckel, die mit feuchtem Filtrierpapier ausgelegt war.

II. Blutausstriche mit Brilliantkresylblau gefärbt

Die zu dieser Färbung benötigte Farbstoffstammlösung wird wie folgt hergestellt:

- a. 10 ml 40%iger Formaldehyd und 12 g Kochzucker. Das Ganze wird mit Sörensen Pufferlösung pH 7,2 auf 100 ml aufgefüllt.
- b. In diesen 100 ml werden zusätzlich 200 mg Brilliantkresylblau gelöst.

Zur Färbung wird die Lösung b mit der Lösung a 1:10 verdünnt.

Die konzentrierte Farbstofflösung b scheint unbegrenzt haltbar zu sein, wenn sie in einem braunen Glas aufbewahrt wird. Die verdünnte Färbelösung verliert nach etwa einem Monat deutlich an Färbekraft. Zur Verdünnung der Farbstoffstammlösung muß daher jeweils frisch zubereitetes Lösungsmittel benutzt werden.

Die Herstellungsvorschrift der Sörensen-Pufferlösung wurde dem Buch von E. Merck (23) entnommen. Da für unsere Färbung ein pH Wert von 7,2 nötig ist, müssen 72 Teile 1/15m Dinatriumhydrogenphosphat- und 28 Teile 1/15m Kaliumhydrogenphosphat-Lösung gemischt werden.

Als Ausstrichgläschen wurden die von Undritz (42) beschriebenen speziellen Ausstrichgläschen verwendet, die planparallel, rechtwinklig und scharfkantig geschliffen sind. Es wurde die von Jancso (18) beschriebene Methode des nachgezogenen Blutropfens angewandt. Den Objektträger für den Blutausstrich legt man auf den Tisch, hält ihn mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand an einem Ende fest, setzt das Ausstrichgläschen mit seiner vorderen Kante am anderen Ende in spitzem Winkel auf und neigt das Gläschen so weit, bis sich das Bluttröpfchen im Winkel hinter dem Ausstrichglas gleichmäßig ausbreitet. Nun wird das Ausstrichgläschen mit gleichmäßigem, leichtem Druck und gleichmäßiger Geschwindigkeit unter Beibehaltung des spitzen Winkels über den Objektträger geschoben, wobei hinter dem Gläschen der Ausstrich entsteht. Ausstrichwinkel und Ausstrichgeschwindigkeit wollen so gewählt werden, daß der Tropfen vollständig ausgestrichen ist, bevor man das Ende des Objektträgers erreicht hat. Der Blutausstrich darf die Kanten des Objektträgers nirgends berühren und soll so dünn sein, daß die Erythrozyten dicht nebeneinander, aber nicht übereinander liegen.

Die so gewonnenen und getrockneten Ausstriche wurden nur an den Kanten angefaßt und bis zur Färbung vor Verunreinigungen geschützt in Mappen aufbewahrt.

Die luftgetrockneten Präparate werden eine Minute mit 70%igem Methanol fixiert, anschließend 20 Minuten luftgetrocknet, um den Alkohol abzdunsten. Dann werden sie drei Minuten in eine Küvette mit der Brilliantkresylblau-Färbelösung gestellt. Nach der Färbung werden die Präparate mit Aqua dest. abgespült und luftgetrocknet.

III. Blutausstriche,

gefärbt mit Brilliantkresylblau wie II, gegengefärbt mit Giemsa-Lösung.

Zur Herstellung dieser Präparate verfahren wir genauso wie bei Färbung II, nur werden die Präparate nach dem Abspülen mit Aqua dest. drei Minuten mit Giemsa-Lösung gegengefärbt. Die Original-Giemsa-Lösung wird verdünnt (1 ml Giemsa-Stammlösung auf 5 ml Aqua dest.) und wegen der sonst auftretenden Verunreinigungen filtriert.

Es wurden verschiedene Giemsa-Gegenfärbungen angefertigt. Die Färbedauer von 1,2,3,5 und 7 Minuten wurde ausprobiert und 3 Minuten als die geeignetste gefunden. Die Leukozyten stellten sich hierbei gut dar, und die Reticulozyten ließen sich nicht schlechter als bei Färbung II differenzieren.

Von 10 Patienten wurden 30 Präparate hergestellt und je 10 Blutausstriche mit den drei Methoden gefärbt. Somit wurden $10 \times 30 = 300$ gefärbte Präparate ausgewertet und 300 000 Erythrozyten gezählt.

Die Anzahl der Reticulozyten , die auf 1000 Erythrozyten entfallen, wurden nach der Einteilung von Heilmeyer differenziert in die Gruppen: O,I,II,III,IV.

Für die mikroskopischen Untersuchungen stand ein binoculares Hellfeldmikroskop der Firma Zeiss zur Verfügung. Das Ölimmersionsobjektiv hat 100fache Vergrößerung und die Apertur 1,30. Bei Zwischenvergrößerung und Objektiv 10fach beträgt die Endvergrößerung 1500.

Als Lichtquelle war eine Niedervoltlampe (6 V,15 W), die vom wechselnden Tageslicht unabhängig macht, vorhanden. Als kleine quadratische Okularblende diente ein selbstgefertigtes Pappscheibchen, in das eine Öffnung von etwa 5 mm Durchmesser geschnitten und das auf die Okularzwischenblende nach Abschrauben der Okularlinse eingelegt wurde (19).

E R G E B N I S S E

In den folgenden Tabellen werden die Prozent-Werte der Heilmeyer-Klassen O-IV für die drei Färbungen wiedergegeben. Jede Zeile bedeutet die Anzahl der Reticulozyten-Klasse auf 1000 gezählte Erythrozyten.

- Ges. = Summe der Klassen O - IV
- Ø = Durchschnittswert der 10 Zählungen
- % = derselbe in Prozent

Patient W.G (Fall 1)

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung I				8	25	33	
				13	17	30	
			1	18	28	47	
			3	7	13	23	
			8	10	5	23	
			4	14	6	24	
			2	13	15	30	
				14	20	34	
				12	17	29	
			1	15	23	39	
Ø	0	0	1.9	12.4	17.0	31.2	
%	0	0	6.1	40.0	53.9	100.0	Ø 31.2

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung II		4			5	9	
		9			6	15	
		9			8	17	
		5			6	11	
		11			4	15	
		9			8	17	
		7			8	15	
		8			5	13	
		10			6	16	
		9			5	14	
Ø	0	8.1	0	0	6.1	14.2	
%	0	57	0	0	43	100	Ø 14.2

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung III		3			8	11	
		3			9	12	
		4			9	13	
		2			5	7	
		6			5	11	
		4			6	10	
		5			9	14	
		10			6	16	
		9			5	14	
		8			7	15	
Ø	0	5.4	0	0	6.9	12.3	
%	0	43.9	0	0	56.1	100	Ø 12,3

Patient H.G (Fall 2)

Färbung
I

	0	I	II	III	IV	Ges.
			3	5	16	24
			2	12	13	27
			4	16	11	31
			4	9	13	26
			2	3	10	15
			2	6	12	20
			1	12	10	23
			4	8	20	32
			1	13	26	40
			2	12	17	31
Ø	0	0	2.5	9.6	14.8	26.9
%	0	0	9.3	35.7	55.0	100

Ø 26.9

Färbung
II

	0	I	II	III	IV	Ges.
				3	11	14
				1	7	8
					10	10
				1	14	15
				3	12	15
				2	11	13
				5	11	16
				7	12	19
				2	13	15
				3	9	12
Ø	0	0	0	2.7	11.0	13.7
%	0	0	0	19.7	80.3	100

Ø 13.7

Färbung
III

	0	I	II	III	IV	Ges.
				5	12	17
				2	10	12
				3	12	15
				5	13	18
				2	11	13
				7	8	15
				6	10	16
				3	10	13
				1	12	13
				2	10	12
Ø	0	0	0	3.6	10.8	14.4
%	0	0	0	25	75	100

Ø 14.4

Patient F.M (Fall 3)

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung I			5	8	9	22	Ø 24.9
			1	8	18	27	
			5	16	12	33	
			3	10	10	23	
			2	9	10	21	
			9	8	3	21	
			5	6	12	23	
			6	12	10	28	
			6	8	11	25	
			8	10	9	27	
Ø	0	0	5.0	9.5	10.4	24.9	
%	0	0	20.1	38.1	42.8	100	

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung II			2	1	9	12	Ø 11.1
			1	1	10	12	
			1	1	7	9	
				3	8	11	
			2	2	9	13	
			2	1	8	11	
			1		6	7	
			2	3	7	12	
			1		12	13	
			1	3	7	11	
Ø	0	0	1.3	1.5	8.3	11.1	
%	0	0	11.7	13.5	74.8	100	

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung III				1	9	10	Ø 10.9
			1		10	11	
				2	7	9	
			2	1	9	12	
			2	3	11	16	
			2	1	9	12	
					9	6	
				1	7	8	
			1	3	10	14	
			1	2	8	11	
Ø	0	0	0.9	1.4	8.6	10.9	
%	0	0	8.3	12.8	78.9	100	

Patient K.I (Fall 4)

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung I			4	11	11	26	
			2	9	12	23	
				8	10	18	
			3	8	12	23	
			1	10	11	22	
			4	8	12	24	
			2	11	8	21	
			2	10	15	27	
			3	11	13	27	
			4	11	14	29	
	Ø	0	2.5	9.7	11.8	24.0	Ø 24.0
%	0	0	10.4	40.4	49.2	100	

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung II		5		1	4	10	
		4			5	9	
		5			5	10	
		4			7	11	
		4		2	7	13	
		6			9	12	
		5		1	9	15	
		5			4	9	
		3		2	6	11	
		3		1	5	9	
	Ø	4.4	0	0.7	5.8	10.9	Ø 10.9
%	0	40.4	0	6.4	53.2	100	

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung III		3			5	8	
		1		2	7	10	
		2			5	7	
		2		1	3	6	
		3			6	9	
		5			10	15	
		2		1	8	11	
		4			3	7	
		2			6	8	
		5			5	10	
	Ø	2.9	0	0.4	5.8	9.1	Ø 9.1
%	0	31.9	0	4.4	63.7	100	

Patient W.M (Fall 5)

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung I		4	7	16	19	46	Ø 45.7
	1	4	8	15	16	44	
	1	5	6	13	20	45	
	2	3	11	12	18	46	
	1	4	11	17	13	46	
	3	6	11	15	15	50	
		4	8	14	20	46	
		4	9	14	14	41	
		4	8	13	17	42	
		2	8	20	21	51	
	Ø	0.8	4.0	8.7	14.9	18.3	
	%	1.8	8.9	19.0	32.6	37.7	
						45.7	100

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung II	1	2		5	8	16	Ø 21.8
			2	8	15	25	
			3	7	9	19	
	3	2	1	4	11	21	
		1	1	7	13	22	
	2	3		10	8	23	
		2	2	4	10	18	
	1		1	9	15	26	
	1	2	2	8	9	22	
	1	1		8	16	26	
	Ø	0.9	1.3	1.2	7.0	11.3	
	%	4.2	6.0	5.5	32.3	52.0	
						21.8	100

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung III		4		10	13	27	Ø 21.5
				8	9	17	
		3		9	8	20	
	1	2		8	11	22	
	2	4		5	15	26	
		5		4	12	21	
	1	5		7	10	23	
	1	2		5	9	17	
	1	2		5	11	19	
	2	4		8	9	23	
	Ø	0.8	3.1	0	6.9	10.7	
	%	3.7	14.4	0	32.6	49.3	
						21.5	100

Patient T,M (Fall 6)

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung I			14	13	11	38	
			10	15	12	37	
			8	13	10	31	
			11	12	9	32	
			5	7	9	21	
			7	12	10	29	
			9	13	15	37	
			15	11	18	44	
			9	14	15	38	
			9	16	13	38	
	Ø	0	9.7	12.6	12.2	34.5	Ø 34.5
	%	0	28.1	36.5	35.4	100	

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung II		6		2	6	14	
		6		3	5	14	
		3		1	12	16	
		8		3	12	23	
		4		3	6	13	
		5		1	11	17	
		5			10	15	
		8		2	13	23	
		6			9	15	
		3		2	10	15	
	Ø	0	5.4	1.5	9.4	16.5	
	%	0	33.1	9.2	57.7	100	Ø 16.5

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung III		6			8	14	
		2		1	13	16	
		8		2	10	20	
		7			12	19	
		3		2	14	19	
		4		1	11	16	
		5		3	12	20	
		7		1	12	20	
		5		1	9	15	
		3		2	12	17	
	Ø	0	5.0	1.3	11.3	17.6	
	%	0	28.5	7.5	64.0	100	Ø 17.6

Patient Sch, M (Fall 7)

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung I			3	7	11	21	Ø 22.4
			3	6	9	18	
	1	1	4	4	9	19	
		1	2	12	10	25	
	1	1	1	8	12	23	
		1	4	8	11	24	
			2	7	12	21	
		1	5	10	8	24	
			2	8	13	23	
			4	9	13	26	
	Ø	0.2	0.5	3.0	7.9	10.8	
	%	0.9	2.2	13.4	35.3	48.2	
						100	

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung II			2	2	9	13	Ø 11.4
				4	6	10	
		1	2	1	10	13	
			1	2	6	10	
				1	5	6	
			3	5	8	16	
			1	2	8	11	
			1	2	7	10	
			2	4	6	12	
			2	3	8	13	
	Ø	0	0.1	1.4	2.6	7.3	
	%	0	0.9	12.3	22.8	64.0	
						100	

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung III				3	9	12	Ø 11.6
			1	2	10	13	
				5	7	12	
				2	10	12	
				3	12	15	
				5	5	10	
			1	2	7	10	
				2	6	8	
				3	8	11	
				4	9	13	
	Ø	0	0	0.2	3.1	8.3	
	%	0	0	1.7	26.7	71.6	
						100	

Patient N,P (Fall 8)

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung I			1	6	17	24	
				4	16	20	
				3	15	18	
				7	16	23	
				5	14	19	
				4	17	21	
				5	17	22	
				5	17	22	
				7	18	25	
				10	16	27	
Ø	0	0	0.2	5.6	16.3	22.1	Ø 22.1
%	0	0	0.9	25.3	73.8	100	

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung II		2			10	12	
		1		1	12	14	
				1	9	10	
		1		2	10	13	
					8	8	
		2		2	15	19	
		2			12	14	
		1			14	15	
					9	9	
				3	12	15	
Ø	0	0.9	0	0.9	11.1	12.9	Ø 12.9
%	0	7.0	0	7.0	96.0	100	

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung III		1		4	10	15	
					11	11	
		3			7	10	
				1	8	9	
		1			8	9	
		3		3	11	17	
		2			12	14	
				2	12	14	
		1		1	8	10	
		1		1	9	11	
Ø	0	1.2	0	1.2	9.6	12.0	Ø 12.0
%	0	10.0	0	10.0	80.0	100	

Patient M,P (Fall 9)

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung I			1	6	16	23	
				7	15	22	
				10	17	27	
			1	5	11	16	
				5	17	23	
				4	18	22	
				7	17	24	
				5	14	19	
			1	8	9	18	
			1	5	12	18	
	0	0	0.4	6.2	14.6	21.2	
	0	0	1.9	29.2	68.9	100	Ø 21.2
	Ø						

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung II				2	5	7	
		2		2	6	10	
		2		1	6	9	
		1		2	10	13	
				2	10	12	
		1		3	7	11	
				2	7	9	
		1		1	8	10	
		1		2	10	13	
				2	12	14	
	0	0.8	0	1.9	8.1	10.8	
	0	7.4	0	17.6	75.0	100	Ø 10.8
	Ø						

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung III		2		1	8	11	
		2			10	12	
		1		1	7	9	
					12	12	
		2		2	7	11	
		1			12	13	
				1	9	10	
		2			6	8	
		2			10	12	
		3		2	6	11	
	0	1.5	0	0.7	8.7	10.9	
	0	13.8	0	6.4	79.8	100	Ø 10.9
	Ø						

Patient R,M (Fall 10)

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung I			4	6	11	21	Ø 23.8
			2	7	14	23	
			1	7	17	25	
				5	15	20	
			1	6	19	26	
			1	4	19	24	
			2	7	15	24	
			1	7	16	24	
			2	5	16	23	
			2	6	20	28	
Ø	0	0	1.6	6.0	16.2	23.8	
%	0	0	6.7	25.2	68.1	100	

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung II		4		3	9	16	Ø 16.6
		3		2	11	16	
		1		4	12	17	
		6		5	12	23	
		4		5	7	16	
		3		1	5	9	
		3		3	9	15	
		2		3	8	13	
		5		6	9	20	
		8		5	8	21	
Ø	0	3.9	0	3.7	9.0	16.6	
%	0	23.4	0	22.2	54.4	100	

	0	I	II	III	IV	Ges.	
Färbung III		6			11	17	Ø 16.8
		4		1	12	17	
		2		1	12	15	
		6			10	16	
		5		2	11	18	
		4		1	15	20	
		3		1	14	18	
		2			9	11	
		4			12	16	
		5		2	13	20	
Ø	0	4.5	0	0.8	12.2	16.8	
%	0	26.2	0	4.8	69.0	100	

In den folgenden graphischen Darstellungen wurde der durchschnittliche prozentuale Anteil der Zelltypen nach Heilmeyer (O-IV) der zehn Patienten aufgetragen.

% ↑

Patient W.G (Fall 1)

— Färbung I

— Färbung II

... Färbung III

100

50

0

I

II

III

IV

Zelltypen nach Helmeyer

% ↑

Patient H.G (Fall 2)

100

50

0

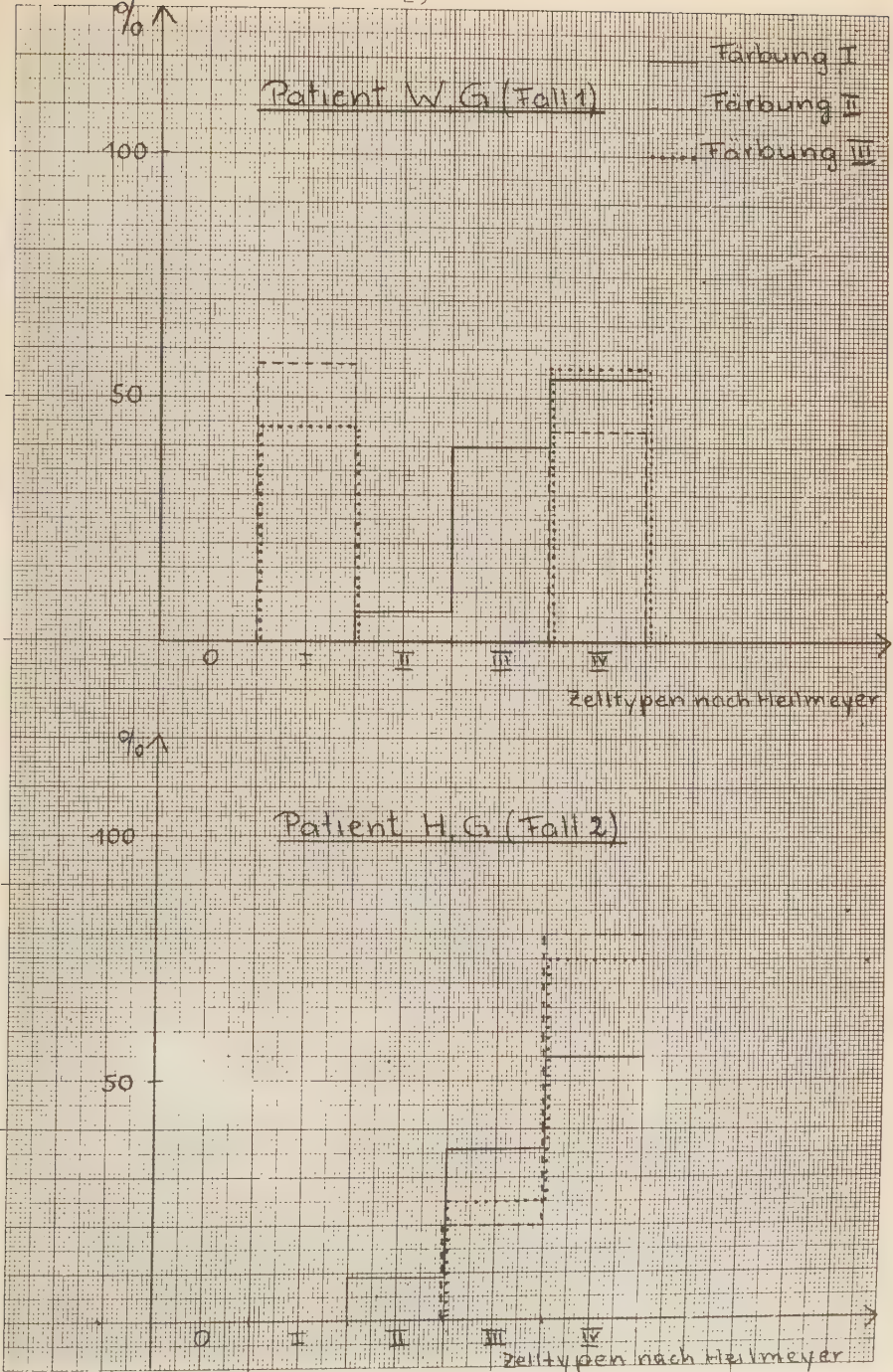
I

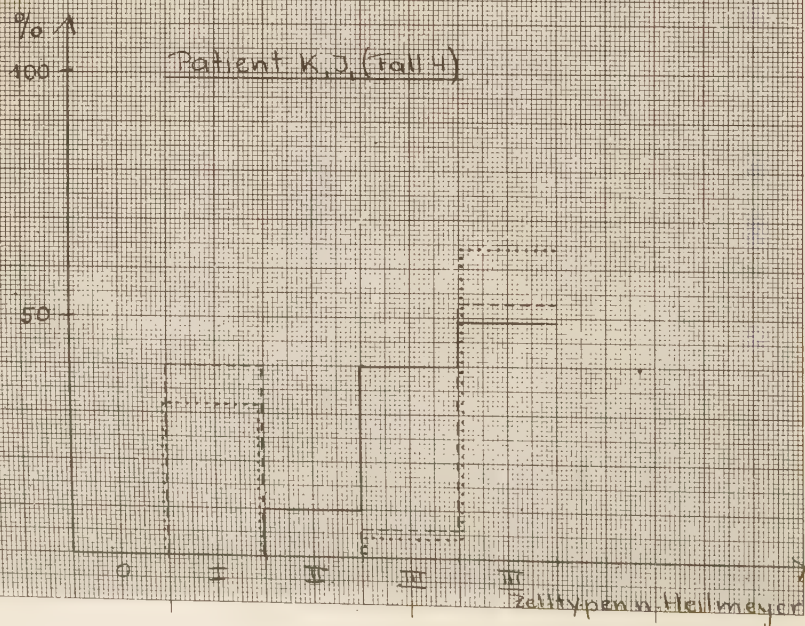
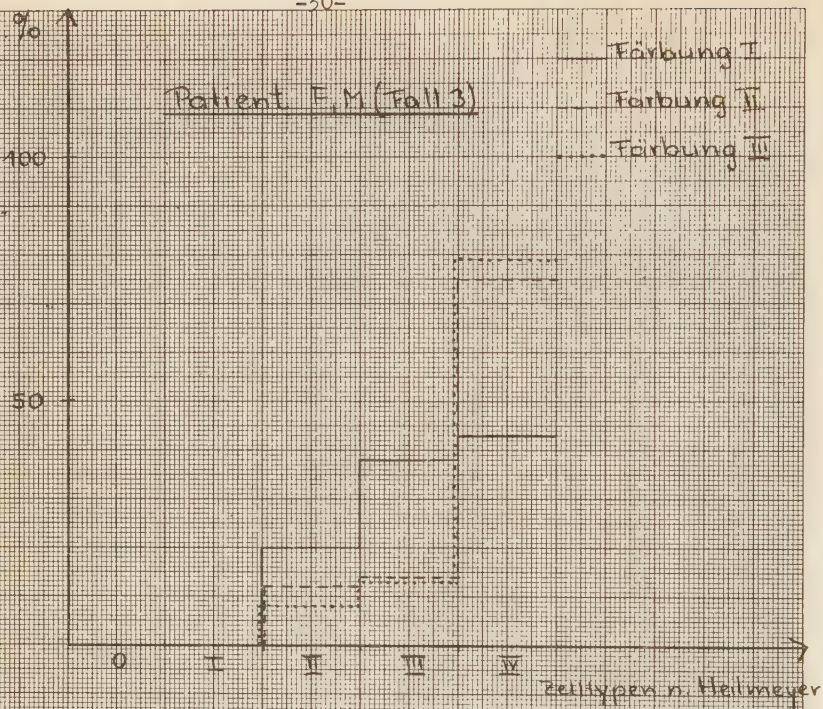
II

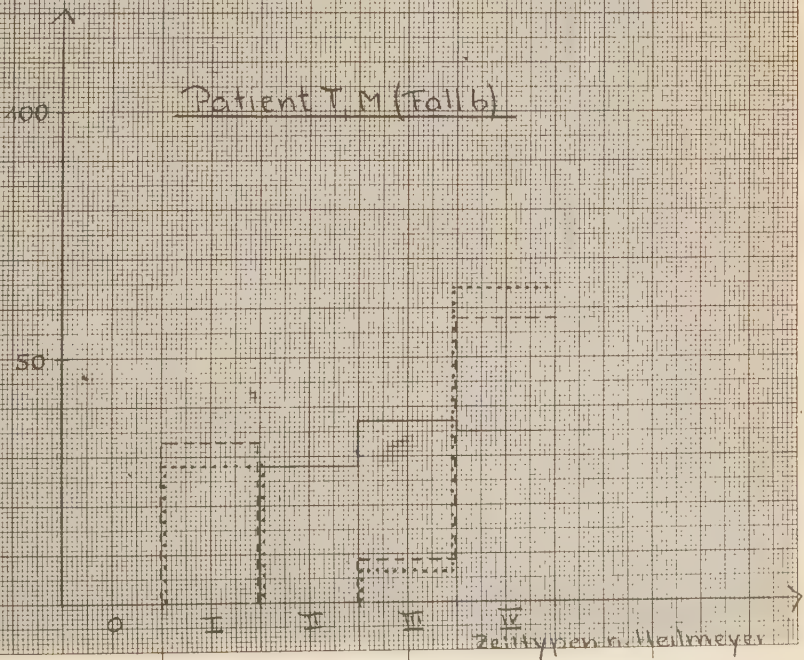
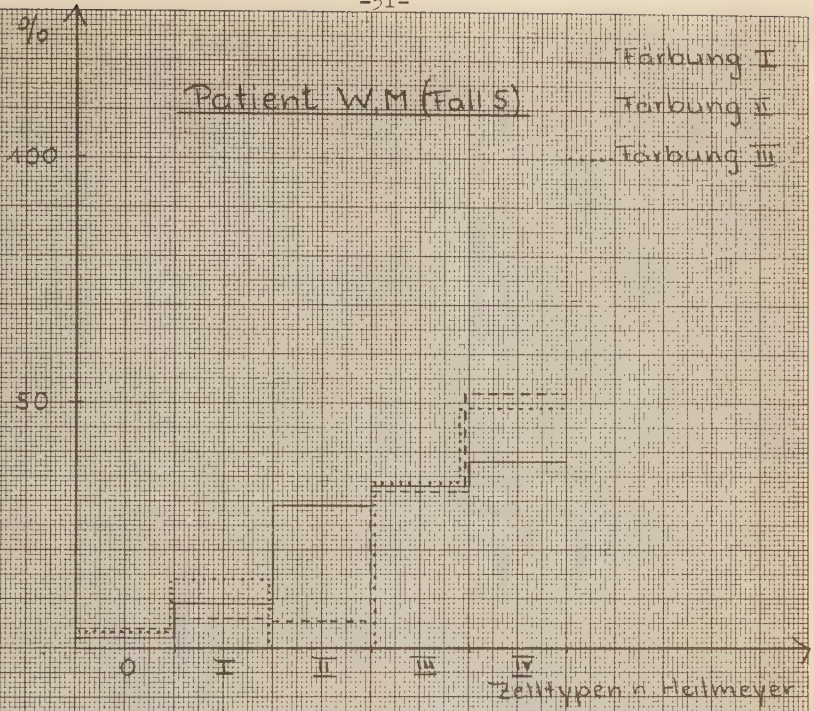
III

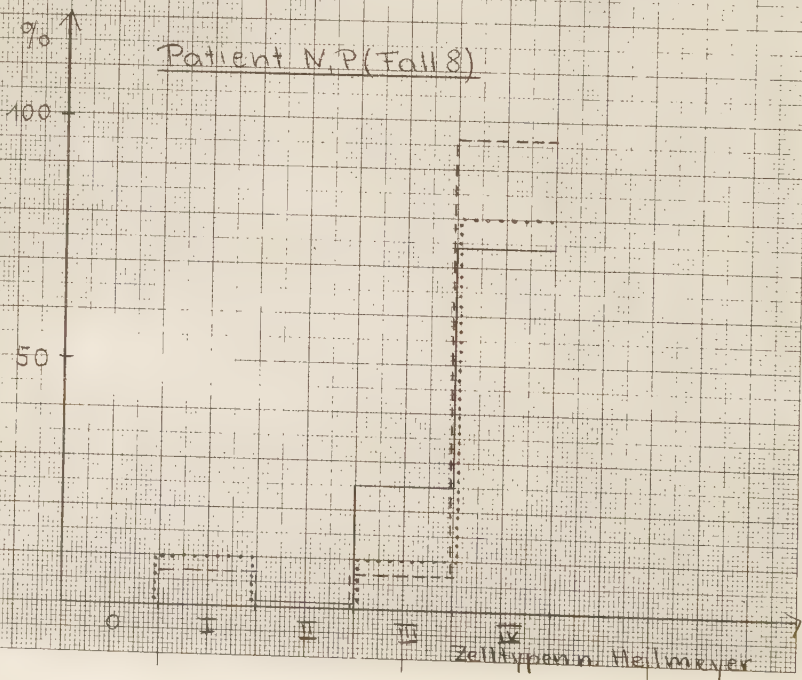
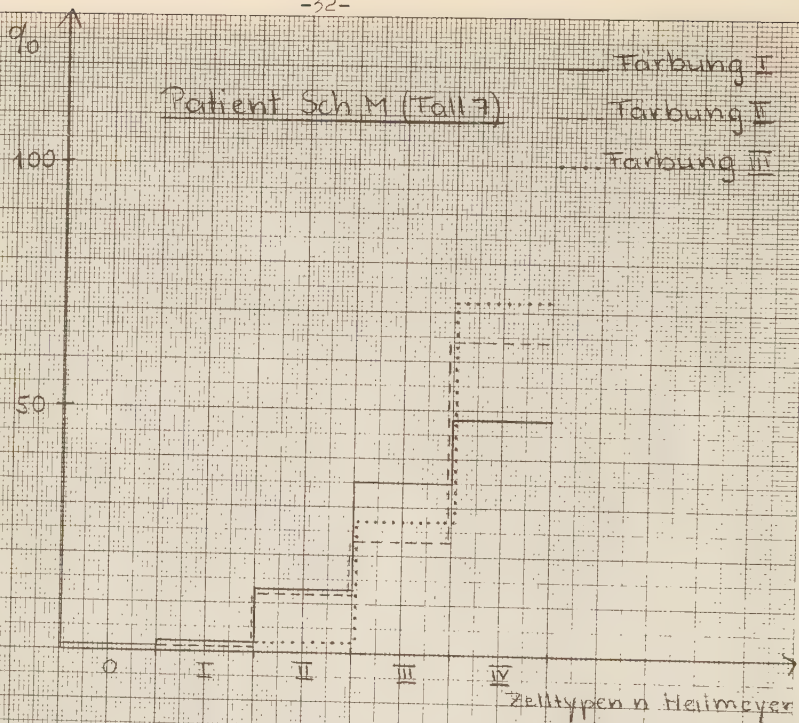
IV

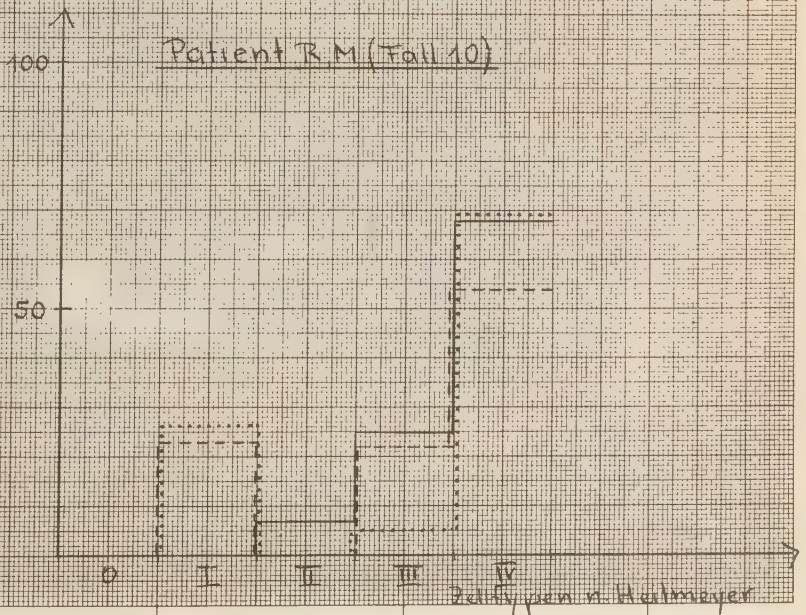
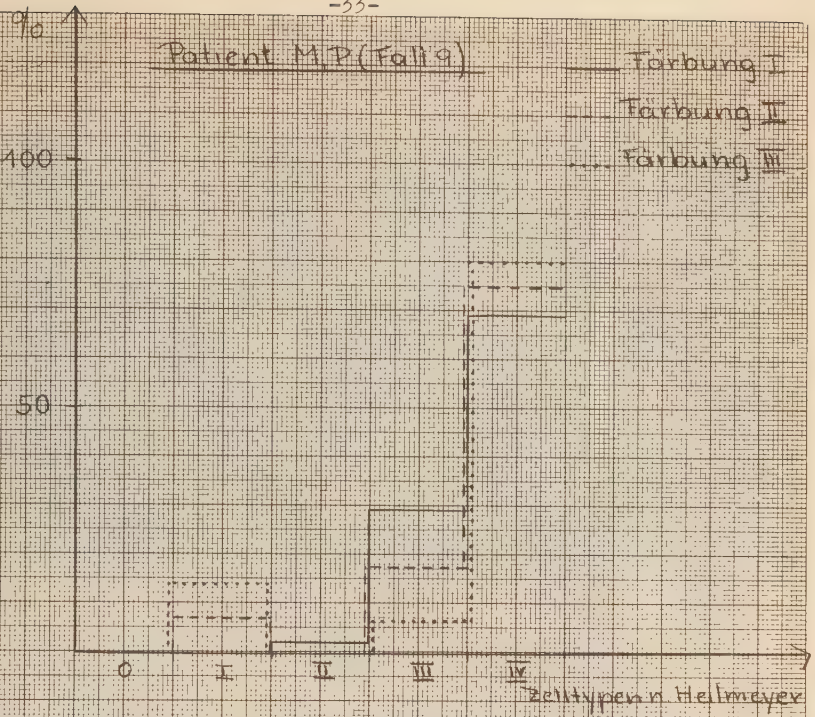
Zelltypen nach Helmeyer











Die folgenden Photographien zeigen,
wie sich die Zelltypen der Heilmeyer-
Klassen (O-IV) bei den verschiedenen
Färbungen darstellen.

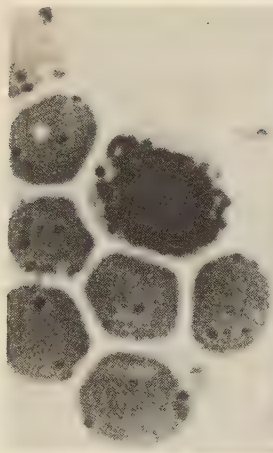


Abb.1
Klasse 0

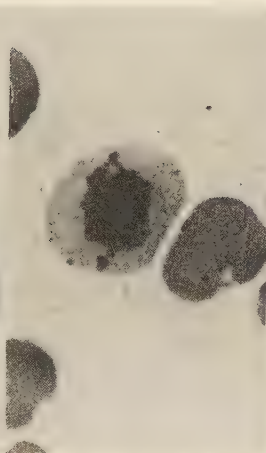


Abb.2
Klasse I

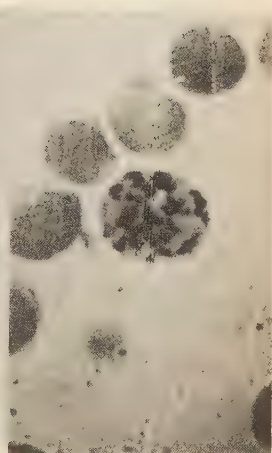


Abb.3
Klasse II

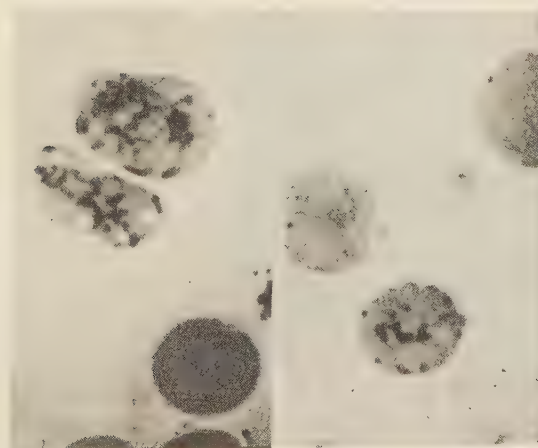


Abb.4
Klasse III

Abb.5
Klasse IV

Darstellung der Reticulozyten mit Supravitalfärbung
(mit Brilliantkresylblau)

Abb. 1-5 zeigt die Heilmeyer-Klassen 0 -IV

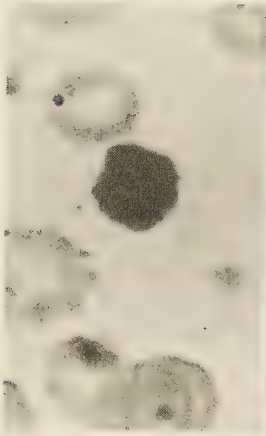


Abb.6
Klasse 0

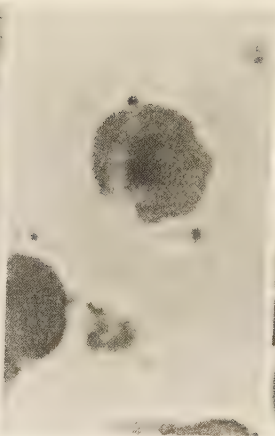


Abb.7
Klasse I

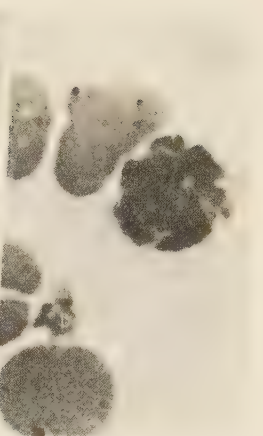


Abb.8
Klasse II

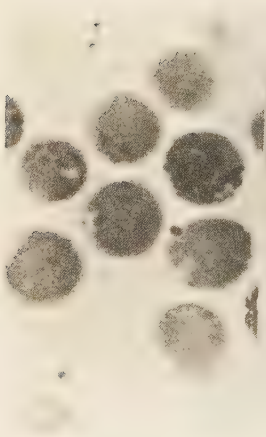


Abb.9
Klasse III

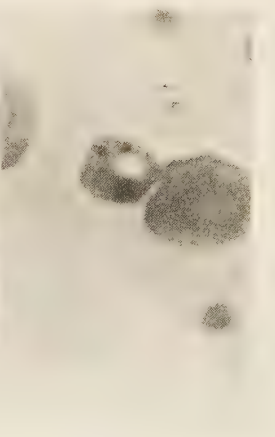


Abb.10
Klasse IV

Darstellung der Reticulozyten auf dem Blutaussstrich
(mit Brilliantkresylblau)

Abb. 6-10 zeigt die Heilmeyer- Klassen 0 -IV

S T A T I S T I K

Von der beobachteten Häufigkeit in unseren Stichproben soll auf die Häufigkeit der Grundgesamtheit geschlossen werden. Hierzu wurde das χ^2 -Verfahren nach der Formel

$$\chi^2 = \frac{(\sum (B-E)^2)}{E}$$

angewendet¹⁾. Es wurden die Zählwerte der Färbung I mit denen der Färbung II und die Werte der Färbung I mit denen der Färbung III gegenübergestellt.

Die Beobachtungswerte wurden nach χ^2 am Institut elektronisch ausgewertet.

Zur Beurteilung der Übereinstimmung unserer empirischen Verteilung mit der theoretischen, muß man für χ^2_4 (4 Freiheitsgrade) die dazugehörigen Wahrscheinlichkeitswerte (P) ermitteln. Es wurden dazu die graphischen Tafeln von Pätou¹⁾ verwendet.

In beiden Vergleichen ist P 0,01. Somit kann die Differenz beider Zählreihen als signifikant angesehen werden. Färbung II mit Färbung III verglichen ergibt keine Signifikanz.

1) Pätou zitiert nach Belitz, H.J.
Der Mathematikunterricht, Heft 1/60
Ernst Klett, Verlag Stuttgart

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Aus den Zähltabellen läßt sich in allen 10 Fällen deutlich ersehen, daß die Färbung der Reticulozyten auf dem Ausstrich gegenüber der Supravitalfärbung ungefähr 50% ergab. Die zusätzliche Gegenfärbung mit Giemsa veränderte den Prozentsatz der Reduktion der Reticulozytenzahl unwesentlich. Durch Färbung II war bei den Fällen 1,3,4,5 und 8 der durchschnittliche Anteil der gezählten Reticulozyten etwas geringer, bei den Fällen 2,6,7,9 und 10 etwas höher.

Die Reduktion bei den Klassen nach Heilmeyer war nicht einheitlich. Nur bei den Fällen 5 und 7 waren alle Klassen von 0-IV vertreten. Der Durchschnittswert der Klasse 0 veränderte sich bei Fall 5 nicht, bei Fall 7 hingegen waren keine Zellen der Gruppe 0 mehr bei der Reticulozytenfärbung auf dem Ausstrich und der Reticulozytenfärbung mit Gegenfärbung zu sehen. (Tab. S. 34, Abb. 1,6).

Die Reduktion der Reticulozytenklasse I war ungefähr 50% bei Fall 5, bei Fall 7 fanden sich bei der Ausstrich-Reticulozytenfärbung nur noch 20% der Zellen dieser Art, bei der Reticulozytenfärbung mit Gegenfärbung keine Zellen dieser Klasse. (Tab. S.32,34, Abb. 2,7).

Die Zellen der Heilmeyer-Klasse II waren bei Fall 7 auf ca 30% reduziert, bei Fall 3 auf 20%, bei Fall 5 war die Reduktion noch mehr. Bei Fall 2 wurde eine Reduktion auf 0% gefunden. Bei den Fällen 1,4,6,8,9 und 10 gab es bei Färbung II und III ebenfalls keine Zellen der Klasse II, jedoch viele Zellen der Klasse I, die offenbar bei der Supravitalfärbung als II identifiziert worden waren. (Abb.3,8,7)

Die Reduktion der Reticulozyten der Klasse III war bei allen Fällen sehr unterschiedlich. Sie ging von 30% über 20%, 10% auf 0%. (Abb. 4,9).

Die Reticulozyten der Klasse IV waren im Durchschnitt wesentlich weniger reduziert als alle anderen Zellen und zwar häufig nur auf 60%. (Abb. 5,10).

Die angefertigten Grafiken zeigen übersichtlich den prozentualen Anteil der Heilmeyer-Klassen O-IV bei den drei durchgeführten Färbungen.

Die Qualität der 3 Minuten mit Giemsa gegengefärbten Präparate reicht aus, um die kernhaltigen Leukozyten gut zu identifizieren (Abb. 11).

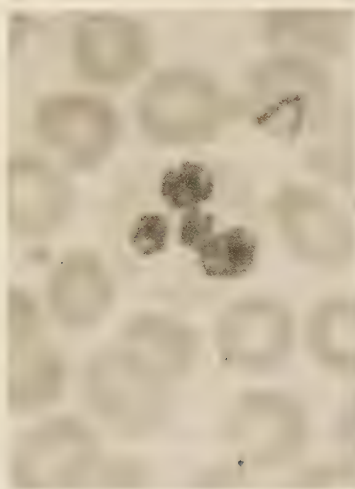


Abb. 11

Auf den Fotos (Abb. 1-10) sind Beispiele gezählter Reticulozyten der Heilmeyer-Klassen O-IV zu sehen. Die Gegenüberstellung der Reticulozyten auf dem Ausstrich und der Supravitalfärbung zeigt gut die unterschiedliche Zeichnung der Substantia granulofilamentosa. Bei Färbung I war die Sgf gut sichtbar und ohne Schwierigkeit den einzelnen Klassen zuzuordnen. Bei Färbung II und III schien die Sgf oft verklumpt oder nur in Bruchstücken vorhanden.

D I S K U S S I O N

Die Bestimmung des Reticulozytengehaltes im peripheren Blut stellt für den klinischen Gebrauch die geeignetste Methode dar, um die erythropoetische Produktionsrate zu beurteilen.

R. Regensburger (30) beschreibt eine neue Methode zur Darstellung der Reticulozyten im Knochenmark. Diese Färbung sollte alle Bedingungen erfüllen:

1. Die Retic. sollten weniger angefärbt und lassen sich in die Klassen nach Heilmeyer differenzieren.
2. Alle Knochenmarkszellen müssen voneinander abgrenzbar dargestellt werden.

Die bekannten Ausstrich-Verfahren erfüllten die zweite Bedingung nicht. Die Brilliantkresylblaukonzentration wurde schrittweise erniedrigt. Obwohl die Brilliantkresylblaukonzentration nicht mehr für die Darstellung der Reticulozyten ausreichte, waren immer noch Zelltrümmer in den Ausstrichen zu finden. Verwertbare Färbeargebnisse waren nur zu erwarten, wenn es gelang, die Zellzerstörung durch Fixierung zu vermeiden. Auch die Applikation des Farbstoffes in blutisotoner Lösung, wobei chemisch inerten Kochzucker zur Auffüllung der Osmolarität benutzt wurde, konnte die Zellzerstörung nicht verhindern.

Die Färbeargebnisse wurden erreicht, indem der Farbstoff in 40%iger Formalinlösung unter Wahrung des physiologischen osmotischen und des pH-Wertes eingebracht wurde. Die Substanz des Reticulozyten wurde jedoch zu schwach angefärbt.

und unterschied sich nicht viel vom Stroma. Durch vorherige Fixierung der Präparate hoffte man, diesen Mangel auszugleichen. 70%iges Methanol erschien für diese Vorbehandlung wirksam. So konnten durch die Kombination der Vorfixierung mit Methanol und der Färbung und Fixierung durch isoosmotische und isohydrische Brilliantkresylblaulösung in 40%igem Formalin die Zellen differenzierbar dargestellt und die Sgf sichtbar gefärbt werden.

Die gewählte Methode stellt Strukturen an fixiertem Material dar, die bisher nur mit einer Supravitalfärbung nachgewiesen werden konnten. Die Sgf und die Kernsubstanz färben sich tiefblau, das Protoplasma hellblau, während die Erythrozyten einen grünlich-blauen Ton annehmen.

Somit konnten im selben Ausstrich Knochenmarkzellen und Reticulozyten differenziert werden. Diese für Knochenmarksausstriche entwickelte Reticulozytenzählung wandten wir auf Blutausstriche an.

Damit die Zellen der weißen Reihe, wie es beim Differentialblutbild üblich ist, besser zugeordnet werden können, wurde noch eine Reihe zusätzlich mit Giemsa-Lösung gegengefärbt. Die zuerst aufgetretenen Verunreinigungen durch Farbniederschläge der Giemsa-Lösung, die das Erkennen der Sgf fast unmöglich machten, konnten durch Filtrieren der Färbelösung eliminiert werden. Nach einigen Vorversuchen entschieden wir uns, die Giemsa-Lösung nur drei Minuten einwirken zu lassen, da sich bei längerer Einwirkung die Sgf nicht scharf genug gegen das Stroma abzeichnete.

Unsere Zählergebnisse lassen bei dieser neuen Reticulozytenfärbung eine Reduktion von ungefähr 50% gegen die Supravitalfärbung erkennen. Die Reticulozytenfärbung

mit Gegenfärbung nach Giemsa brachte keinen weiteren Verlust an zählbaren Reticulozyten.

Die Lokalisation der Sgf, also die Klasseneinteilung nach Heilmeyer, unterschied sich kaum (Abbildungen), aber die Netze der Sgf waren in den meisten Fällen nicht so klar zu erkennen wie bei den Supravitalfärbungen der Reticulozyten. Die Zellen, die nach der Anordnung der Sgf der Heilmeyer-Klasse I zugerechnet werden mußten, sahen fast ausnahmslos anders aus. Man erkannte keine Granula, sondern in der Mitte der Zelle lag eine verklumpte Masse. Bei gut der Hälfte der Präparate konnten die bei Supravitalfärbung als Heilmeyer-Klasse II differenzierten Zellen nicht mehr erkannt werden. Es fanden sich nur Zellen, die ähnlich der Heilmeyer-Klasse I waren. Offenbar sintert die Sgf bei der Fixation durch Lufttrocknung zusammen.

Die Farbstoffaffinität war bei der Ausstrich-Färbung nicht immer einheitlich. Teilweise färbten sich die Reticulozyten intensiver als die übrigen Erythrozyten.

Form und Größe der Zellen variierten in einigen Fällen. Gerade die Reticulozyten erschienen oft gequollen oder geschrumpft.

Die Zellen der weißen Reihe konnten nach Gegenfärbung mit Giemsa-Lösung ohne Schwierigkeit erkannt und differenziert werden.

Man könnte also die Färbung nach May und Grünwald durch unsere Vorbehandlung mit isotoner und isoosmotischer Brilliantkresylblaulösung ersetzen, um in einem Arbeitsgang die Reticulozyten mitzuerfassen.

Im Normalfall würden 100 Leukozyten in etwa 1000 Reticulozyten entsprechen, aber jede Anämie oder Leukozytose würde dieses Verhältnis verschieben. Damit die Relation stimmt, müßte man umrechnen:

$$\begin{array}{c} \text{absolute Reticulozytenzahl} / \text{mm}^3 \\ = \\ \frac{\text{gezählte Reticulozytenzahl auf 100 Leukozyten}}{\text{Absolutzahl der Kammer-Leukozyten}} \end{array}$$

Die Vorfärbung erschwert den Arbeitsgang. Da die Verdünnungslösung sich bis zu einem Monat hält und nicht täglich neu angesetzt werden muß, ist der Mehraufwand nicht erheblich.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Von 10 Patienten mit hohem Reticulozyten-Prozent-Gehalt wurden je 10 Präparate supravital mit Brilliantkresylblau gefärbt, 10 nach einer bei uns im Labor neu entwickelten Färbe-Methode mit Brilliantkresylblau auf dem Ausstrich und 10 Präparate außerdem gegengefärbt mit Giemsa-Lösung. Auf 10 X 30 Präparaten wurden die Reticulozyten nach den Heilmeyer-Klassen O-IV differenziert.

Die Reduktion der Reticulozytenzahlen bei der neuen Färbung war ungefähr 50%, die Gegenfärbung mit Giemsa veränderte den Prozentsatz nicht wesentlich. Somit wäre es eine Überprüfung wert, ob diese in unserem Labor neu entwickelte Methode zur Erfassung der Reticulozyten beim Differentialblutbild in der Routine angewandt werden kann.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Austoni, M.E. Autoradiographic studies on iron-59 turnover by erythroid cells in rat bone marrow
Wien, Z.inn.Med. 35, 151 (1954)
2. Barbier, H. Über die Schwankungen der Reticulozytenzahlen im strömenden Blut und ihre Ursachen
Kl. Wschr. 1496,1497 (1939)
3. Begemann, H. Praktische Hämatologie
Harwerth, H.G. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1969
S. 210
4. Belcher, E.H. Experimental studies with radioactive iron
Gilbert, J.G. +
Lamerton, J.F. Brit. I. Radiol 27,387 (1954)
5. Borsook, H. Incorporation in vitro of labeled amino acids into proteins of rabbit reticulocytes
Deasey, C.L.
Haagen-Smit, H.J.
Keighley, G. and
Lowy, P.H. I. biol. Chem. 196,669 (1952)
6. Cesaris-Demel, A. Studien über die roten Blutkörperchen mit den Methoden der Färbung in frischem Zustand
Folia Haem. 4 Suppl. 1-32, 1907

7. Cohn, A. Über die Bedeutung der vitalfärbbaren Substanzen in den Erythrozyten und ihre Beziehung zur Sauerstoffzehrung unter Berücksichtigung der Polychromasie und Basophilie
Klin. Wschr. 24, 1079 (1926)
8. Ederle, W. Über die normalen Reticulozytenzahlen
Med. Welt 7, 1095 (1933)
9. Ehrlich, P. Über das Methylenblau und seine klinisch-bakteriologische Verwertung
Z.f.Klin. Med., Berlin, 710 (1880)
10. Engel, H. Über die Reifegrade der Erythrozyten im kreisenden Blut
Fol. Haemat., (Lpz.), 33.21 (1926)
11. Giemsa, G. Färbemethoden für Malariaparasiten
Zbl. Bakt. 31 (1902) 429
 32 (1902) 307
12. Giemsa, G. Über die neue Schnelfärbung mit meiner Azureosinlösung
München, Med. Wschr. 57 (1910) 2476
13. Giemsa, G. Zur Praxis der Giemsaefärbung
Zb. Bakt. 91 (1924) 343
14. Heilmeyer, L. Die Eisenmangelanämie und andere hypochrome Anämien
Heilmeyer- Hittmair: Handbuch der gesamten Haematologie, Bd. 3, Teil 1, 326 (1960)

15. Heilmeyer, L. "Perniziöse Anaemie" als Initialphase einer akuten Erythroleukaemie
Schweiz. med. Wschr. (1950) 1122
16. Heilmeyer, L. + Westhäuser, R. Reifungsstudien an überlebenden Reticulozyten in vitro und ihre Bedeutung für die Schätzung der täglichen Häoglobinsproduktion in vivo
Z. klin. Med. 121,361 (1932)
17. Heimpel, H. Erythropoese und Erythrozytenumsatz
Handbuch d. In. Med., Bd. 2, Teil I, 517, 5. Aufl., Springer Verlag (1968)
18. Jancsó, M. + Rosenberger, M. Blutuntersuchungen
Dtsch. Arch., Klin. Med. 57, 449 (1896)
19. Leitz, E. Das Mikroskop und seine Anwendung
GmbH Wetzlar (1969)
20. Lindigkeit, R. Die Nucleasewirksamkeit in den Reticulozyten von Kaninchen
Fol. Haemat., (Lpz.) 74, 251 (1957)
21. May, R. Eine neue Methode zur Romanowskyfärbung
München, med. Wschr. 53 (1906) 358
22. May, R. + Grünwald, L. Beiträge zur Blutfärbung
Dtsch. Arch. klin. Med. 79 (1904) 468

23. Merck, E. Medizinisch-chemische Untersuchungsmethoden
Verlag Chemie GmbH Weinheim,
10. Aufl. (1962)
24. Morawitz, P. Über Oxydationsprozesse im Blut
Naunyn-Schmiedeberges Arch., exp.
Path. Pharmac. 60,298 (1908)
25. Naegeli, O. Blutkrankheiten und Blutdiagnostik
4. Aufl. 588, Verl. Springer,
Berlin 1923
26. Pappenheim, A. Grundriß der Farbenchemie zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten
Hirschfeld, Berlin 1901
27. Pappenheim, A. Eine panoptische Triazidfärbung
Dtsch. med. Wschr. 25 (1901) 798
28. Pappenheim, A. Panoptische Universalfärbung für Blutpräparate
Med. Klinik 4 (1908) 1244
29. Rappoport, S. Der Atmungsstoffwechsel bei der Reifung der Erythrozyten. Aktivatoren und Hemmstoffe
Fol. Haemat., 74,276 (1957)
30. Regensburger, R. Die Veränderung der Reticulozytenzahl in der Koagulum-Kultur
Berlin 1970
31. Riva, G. Dunkelfelduntersuchungen an Reticulozyten und besophil punktierten Erythrozyten
Schweiz. med. Wschr. 840 (1949)

32. Rind, H. +
Stobbe, H. Über "reife" und "unreife" Reticu-
lozyten
Fol. Haemat. NF 13, 219 (1957)
33. Rosin, H. +
Bibergeil, E. Über die vitale Blutfärbung und deren
Ergebnisse bei Erythrozyten und
Blutplättchen
Z. Klin. Med. 54, 197 (1904)
34. Rümke, C.L. Die Zelldifferenzierung in Blutauss-
strichen
Triangel (Sandoz) 4, 154 (1960)
35. Schilling, V. Arbeiten über Erythrozyten
Fol. Haemat., (Lpz.) 14,95 (1912)
36. Seip, M. Reticulocyte studies
Acta medica scandinavica
Oslo (1953) Johann Grundt, Tanum-
Forlag, 22
37. Seyfarth, C. Experimentelle und klinische Unter-
suchungen über die vitalfärbbaren
Erythrozyten
Fol. Haemat., (Lpz.) 34,7 (1927)
38. Siering, H. Reticulozytenzählung mit dem Phasen-
kontrastverfahren
Fol. Haemat., (Lpz.) 73,1 (1956)
39. Stobbe, H. +
Rind, H. Morphologische Beobachtungen an Reti-
culozyten mit dem Phasenkontrast-
verfahren
Fol. Haemat., (Lpz.) 76, (1939), 353

40. Schweiger, H.G. Proteinsynthese und Ribonuclein-
säure in kernlosen Reticulozyten
Die Naturwissenschaften 51,521 (1964)
41. Thorell, B. Cytochemistry of red blood cell matu-
ration
Fol. Haemat.(Lpz), 78, 7 (1962)
42. Undritz, E. Herstellung von Blut- und Knochen-
markausstrichen
Triangel 4, 36 (1959)
43. Walsh, R.J. Iron metabolism heme syntheses in
Thomas, E.D. + vitro by immature erythrocytes
Chow, S.K. Science 110, 396 (1949)
44. Warburg, O. Zur Biologie der roten Blutzellen
Hoppe-Syler, Z. physiol. Chem.
59, 112 (1909)
45. Wolpers, C. Elektronenmikroskopische Untersuchun-
gen an Innenstrukturen kernloser
Erythrozyten
I Reticulozyten und Pseudoreticulo-
zyten
Klin. Wschr. 34, 61 (1956)

Für das Thema, die guten Arbeitsmöglichkeiten, sowie das fördernde und kritische Interesse möchte ich an dieser Stelle Frau Professor Dr. med. Irene Boll meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Professor Belitz danke ich ebenfalls für seine freundliche Hilfe.

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie
EURATOM-GSF, Nr. 031/64/1 BAD I.

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

L E B E N S L A U F

Am 23. April 1939 wurde ich, Margit Wester, geb. Stark, als Tochter des Rechtsanwalts und Notars Dr. Wilhelm Stark und seiner Ehefrau, der Diplom-Handelslehrerin Ilse Stark, geb. Römer, geboren.

Von 1945 -1953 besuchte ich die 17. Grundschule in Berlin-Biesdorf. Vier Jahre war ich Schülerin der Franz-Mehring-Oberschule in Berlin-Lichtenberg, und 1958 bestand ich das Abitur an der Robert-Koch-Oberschule in Berlin-Kreuzberg.

Seit dem Winter-Semester 1958 war ich Studentin der Freien Universität Berlin. Nach 5 Semestern Humanmedizin studierte ich seit 1962 Zahnmedizin und legte im Sommer-Semester 1967 mein zahnärztliches Staatsexamen ab. Nach 4 Assistentenjahren habe ich seit April 1971 eine eigene Praxis in Berlin-Wilmersdorf.

Im Juni 1969 heiratete ich den Diplom-Kaufmann Manfred Wester. Wir haben eine Tochter.

